RESEARCH ARTICLES – ARTICOLE DE CERCETARE – ARTICLES DE RECHERCHE – НАУЧНЫЕ СТАТЬИ

BIOLOGICAL SCIENCES

EVALUAREA VIABILITĂŢII TULPINILOR DE DROJDII DUPĂ 15 ANI DE CONSERVARE

Tamara SÎRBU, Valerina SLANINA
IP Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, Republica Moldova
Autor corespondent: Tamara Sîrbu, e-mail: tfsirbu@gmail.com

DOI: 10.38045/ohrm.2022.3.03 CZU: 582.282/.284.082.

Keywords: *yeast strains, genus, viability, lyophilization, revitalization, Vaseline oil.*

EVALUATION OF THE VIABILITY OF YEAST STRAINS AFTER 15 YEARS OF CONSERVATION

Introduction. *The sustainable and efficient storage of microorganisms in collections depends on the correct selection of the conservation method, parameters and protection media.*

Material and methods. *The viability and stability of the morpho-cultural properties of the yeasts from CNMN, kept under a layer of Vaseline oil and in a lyophilized state for 15 years, were evaluated.*

Results. *The study of the viability of 17 yeast strains from National Collection of Non-pathogenic Microorganisms, after 15 years of storage by methods: lyophilization and under a layer of Vaseline oil, showed that their viability and stability vary depending on genus. Thus, the viability of lyophilized strains, from the genus Rhodotorula varied in the limits of 47.0-65.7%, from the genus Saccharomyces – 46.4-58.8%, and from the genus Lipomyces – 64.0-77.8%, compared with the viability recorded after lyophilization. It has also been established that all yeast strains, kept under a layer of Vaseline, are viable, but show some changes in morpho-cultural properties. Thus, in the strains of the genus Rhodotorula and the genus Saccharomyces, inoculated on agarized media, the colonies in the first passage were very small, the color different from the original one. No changes were detected in the strains of the genus Lipomyces. It has been shown that the initial morpho-cultural properties are restored more quickly, if the cultures, kept under oil, are inoculated in liquid malt, then made 2-3 consecutive passages on agarized media.*

Conclusions. *Methods of preserving yeast strains in the lyophilized state or under a layer of Vaseline oil are very effective and promising, ensuring high viability and stability.*

Cuvinte cheie: *tulpini de drojdii, gen, viabilitate, liofilizare, revitalizare, ulei de vaselină.*

Introducere. *Păstrarea durabilă și eficientă a microorganismelor în colecții depinde de selectarea corectă a metodei de conservare, a parametrilor și a mediilor de protecție.*

Material și metode. *A fost evaluată viabilitatea și stabilitatea particularităților morfo-culturale ale drojdiilor din CNMN, păstrate sub un strat de ulei de vaselină și în stare liofilizată, timp de 15 ani.*

Rezultate. *Studiul a 17 tulpini de drojdii din Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene, după 15 ani de depozitare prin metodele de liofilizare și sub un strat de ulei de vaselină, a demonstrat că viabilitatea și stabilitatea acestora variază în funcție de gen. Astfel, viabilitatea tulpinilor liofilizate din genul Rhodotorula a variat în limitele 47,0-65,7%, a celor din genul Saccharomyces – 46,4-58,8%, iar din genul Lipomyces – 64,0-77,8%, comparativ cu viabilitatea înregistrată după liofilizare. De asemenea, s-a stabilit că toate tulpinile de drojdii, păstrate sub un strat de ulei de vaselină, sunt viabile, dar prezintă unele modificări ale particularităților morfo-culturale. Astfel, la tulpinile din genul Rhodotorula și genul Saccharomyces, inoculate pe medii agarizate, coloniile în primul pasaj erau foarte mici, culoarea fiind diferită de cea inițială. La tulpinile din genul Lipomyces astfel de modificări nu au fost depistate. S-a demonstrat că particularitățile morfo-culturale inițiale se restabilesc mai repede, dacă culturile, păstrate sub ulei, sunt inoculate în malț lichid, apoi sunt efectuate 2-3 pasaje consecutive pe medii agarizate.*

Concluzii. *Metodele de conservare a tulpinilor de drojdii în stare liofilizată sau sub un strat de ulei de vaselină sunt foarte eficiente și de perspectivă, asigurând o viabilitate și stabilitate înaltă.*

INTRODUCERE

Microorganismele – procariote, virusuri, viroizi, ciuperci filamentoase, drojdii, microalge și protozoare – cuprind cel mai mare număr de organisme de pe planeta noastră și sunt creaturi omniprezente ale Pământului (1, 2). Biotehnologia microbiană necesită existența unor colecții de culturi microbiene, deoarece microorganismele menținute în ele furnizează biomolecule, precum și surse de compuși cu o aplicabilitate vastă în cercetare și în industrie (2, 3). Microorganismele, din timpuri străvechi, sunt importante pentru noi din mai multe motive, unul dintre cele mai pregnante constituindu-l faptul că ele se prezintă drept producători valoroși pentru fiecare fază a biotehnologiei, cum ar fi panificația, producția de bere și a de metaboliți secundari: antibiotice, bioinsecticide, biofungicide etc. Cei mai importanți metaboliți primari, din punct de vedere industrial, sunt aminoacizii, nucleotidele, vitaminele, solvenții și acizii organici etc. Tehnologia ADN-ului recombinant a produs, de asemenea, o revoluție în agricultură și a lărgit semnificativ piețele pentru enzimele microbiene (4). Pe lângă aceste aplicații industriale, microorganismele au un rol crucial în ecosisteme, descompunând rămășițele animaliere și ale vegetației în sol, formând relații mutualiste benefice cu diferite plante (2). Microorganismele includ, de asemenea, agenți patogeni care provoacă boli, în unele cazuri, menținând echilibrul ecologic (1, 5).

Colecțiile de culturi microbiene au existat de când bacteriologii au reușit să izoleze și să cultive microorganisme, reprezentând un aspect esențial al microbiologiei (6). Ele prezintă o sursă bogată de microorganisme, care sunt importante pentru trecut, prezent și viitor (7). De obicei, acestea sunt considerate a fi un mijloc de conservare a microorganismelor *ex situ* (5, 8). Rolul colecțiilor de culturi microbiene constă în: (a) colectarea, menținerea și expedierea culturilor microbiene; (b) colectarea datelor despre cultură, pentru a le face accesibile comunității de cercetare microbiologică prin intermediul cataloagelor tipărite sau on-line. Datele despre culturi sunt, de obicei, la fel de valoroase ca microorganismul însuși, iar cercetătorii trebuie să aibă acces la aceste informații. Bazele de date avansate sunt cruciale în acest sens pentru transfer de cunoștințe. Cercetătorii și taxonomiștii pot selecta tulpinile pentru o anumită aplicație de cercetare, prin cataloage tipărite sau baze de date on-line. Aceste date, în special în epoca bioinformaticii, vor deveni și mai prețioase; (c) depozite în condiții de siguranță ale microorganismelor cu distribuție restrânsă; (d) furnizarea de servicii de identificare, în funcție de expertiza colecției de cultură despre diferite tipuri de microorganisme; (e) depozite pentru culturi valoroase (5, 8, 9).

Păstrarea durabilă și eficientă a microorganismelor în colecții depinde de selectarea corectă a metodei de conservare, a parametrilor și a mediilor de protecție. Cercetătorii microbiologi studiază permanent eficacitatea diferitelor metode de conservare îndelungată asupra menținerii caracterelor morfologo-culturale și activității tulpinilor producătoare de substanțe biologic active (10). Valoarea teoretică a acestor cercetări este determinată de necesitatea elucidării mecanismelor trecerii reversibile a celulelor vegetative prin starea de anabioză, în scopul dirijării acestui proces (11). Importanța practică a cercetărilor în domeniul dat este determinată de necesitatea asigurării științei și a industriei microbiologice cu tulpini de o înaltă viabilitate și stabilitate, conform tuturor parametrilor. Actualmente, sunt cunoscute diverse metode de conservare (transfer periodic, sub un strat de ulei mineral, în sol sau apă sterilă etc.), dintre care liofilizarea este considerată a fi metoda optimă pentru cele mai diverse grupuri de microorganisme (12-15).

Liofilizarea este o metodă de conservare a microorganismelor. ce constă într-un proces de înghețare-uscare, bazat pe îndepărtarea apei din materialul celular înghețat, prin sublimare în vid (16-19). Pe parcursul liofilizării, microorganismele sunt expuse la o serie de factori stresanți (temperaturi joase și uscare în vid), în timpul căruia se formează cristale de gheață, care provoacă diverse leziuni ale celulelor vii și duc la moartea lor. O altă cauză a pieirii microorganismelor este stresul oxidativ, în rezultatul căruia apar formele reactive de oxigen, care au un efect negativ asupra celulelor (20-22). Astfel, optimizarea parametrilor de liofilizare și selectarea mediilor de protecție și regenerare eficiente ocupă un loc important în procesul de menținere durabilă a colecțiilor de microorganisme (23, 24).

Scopul cercetărilor propuse constă în evaluarea viabilității și stabilității tulpinilor de drojdii din Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene (CNMN), după 15 ani de conservare.

MATERIAL ȘI METODE

În calitate de obiect de studiu au fost utilizate 17 tulpini de drojdii, depozitate în CNMN, potențiali producători de substanțe bioactive, ce s-au păstrat sub ulei de vaselină și în stare liofilizată, pe 2 medii de protecție: lapte degresat (LD) și lapte degresat 10% (10% LD), timp de 15 ani.

Lista tulpinilor de drojdii studiate:

Rhodotorula gracilis CNM-YS-02;
Rhodotorula gracilis CNM-YS-03;
Rhodotorula gracilis CNM-YS-04;
Rhodotorula gracilis CNM-YS-05;
Rhodotorula gracilis CNM-YS-06;
Hansenula anomale CNM-YS-07;
Rhodotorula glutinis CNM-YS-08;
Rhodotorula rubra CNM-YS-09;
Rhodotorula mucilaginosa CNM-YS-10;
Saccharomyces cerevisiae CNM-YS-11;
Lipomyces lipofer CNM-YS-12;
Lipomyces lipofer CNM-YC-13;
Lipomyces lipofer CNM-YS-14;
Saccharomyces carlsbergensis CNM-YS-15;
Saccharomyces cerevisiae CNM-YS-16;
Saccharomyces cerevisiae CNM-YS-17;
Saccharomyces cerevisiae CNM-YS-18.

Notă: (CNM-YS – Colecția Națională de Microorganisme - drojdie)

Metodele de studiu:

Reactivarea culturii

Reactivarea culturilor de drojdii după liofilizare și păstrare

Au fost rehidratate tulpinile ce se păstrează în stare liofilizată în 2 medii de protecție: lapte degresat și lapte degresat 10%.

În fiola cu tulpina liofilizată s-a adăugat 1 ml apă distilată, s-a lăsat la incubare la t^o=28-30^{o}C, timp de 4 ore, apoi, prin diluții succesive, s-a inoculat pe cutii Petri cu malț agar.

Tulpinile de drojdii, păstrate sub ulei mineral, au fost inoculate inițial în tuburi cu malț lichid de 6B, apoi pe cutii Petri cu malț agarizat și au fost efectuate 2-3 pasaje (23, 25).

Metoda calculului logaritmic al viabilității culturii studiate

Determinarea încărcăturii de germeni viabili prin însămânțarea pe medii de cultură solide, conform metodei Koch, s-a bazat pe faptul, că fiecare celulă viabilă determină formarea unei colonii atunci, când suspensia din materialul analizat a fost etalată pe suprafața unui mediu solid specific. Celulele, care determină formarea de colonii, se numesc *unități formatoare de colonii* (UFC) și numărul lor este aproximativ egal cu numărul de celule microbiene din probă (23, 25).

Determinarea viabilității, conform acestei metode, a cuprins 3 etape:

1. Prepararea diluțiilor succesive: pentru micșorarea densității celulelor de microorganisme s-au pregătit diluții succesive. Numărul diluțiilor a depins de densitatea celulelor utilizate în suspensie.
2. Însămânțarea suspensiei pe mediul agarizat. În cutii Petri sterile s-a turnat mediul nutritiv agarizat, iar după înlăturarea umidității excesive s-a inoculat cultura: 0,1 ml suspensie s-a repartizat cu ajutorul spatulei pe întreaga suprafață a mediului agarizat. Însămânțarea s-a efectuat din ultimele 3 diluții, în 2-4 repetări. După însămânțare, cutiile Petri au fost plasate în incubator la t^o=28-30^{o}C timp de 3-5 zile.
3. Calculul numărului coloniilor formate. Calculul numărului de colonii ale tulpinilor de drojdii s-a realizat după 3-5 zile de termostatare (în funcție de viteza de creștere a tulpinii studiate).

Numărul de celule într-un mililitru de suspensie s-a calculat după formula:

$$\mathbf{M = a \times 10^n / V,}$$

unde:

M – numărul de celule în 1 ml de suspensie;
a – numărul mediu de colonii;
V – volumul de suspensie luat pentru însămânțare, ml;
10^n – coeficientul de diluare (25).

Viabilitatea procentuală a tulpinilor s-a calculat conform formulei:

$$\mathbf{Viabilitatea\ \% = (log\ DL / log\ PL) \times 100,}$$

unde:

Viabilitatea – rata viabilității este raportul dintre **logaritmul** numărului de celule viabile **DL** (după liofilizare) și numărul de celule viabile **PL** (până la liofilizare) înmulțit cu **100%** (26).

REZULTATE

Rezultatele evaluării viabilității tulpinilor de drojdii după 15 ani de păstrare în stare liofilizată, pe mediile de protecție de lapte degresat și 10% lapte degresat, sunt prezentate în Tabelul 1.

Tabelul 1. Viabilitatea tulpinilor de drojdii după 15 ani de conservare în stare liofilizată.

Nr d/o	Tulpina	Mediul protector	Viabilitatea: După liofilizare, Martor (M): Titrul, log_{10} UFCml^{-1}	Viabilitatea: După 15 ani de conservare în stare liofilizată: Titrul, log_{10} UFCml^{-1}	Viabilitatea: După 15 ani de conservare în stare liofilizată: % față de Martor (M)
1	*Rhodotorula gracilis* CNM-YS-02	LD	1,5±0,3 × 10^4	2,7±1,7 × 10^2	56,6±9,2
		10% LD	6,3±1,3 × 10^3	3,3±1,7 × 10^2	65,7±7,5
2	*Rhodotorula gracilis* CNM-YS-03	LD	3,0±0,6 × 10^4	1,3±0,7 × 10^2	47,0±5,4
		10% LD	6,0±3,4 × 10^3	1,3±0,7 × 10^2	56,6±9,5
3	*Rhodotorula gracilis* CNM-YS-04	LD	1,2±0,3 × 10^4	2,3±0,7 × 10^2	57,8±3,7
		10% LD	1,0±0,3 × 10^4	2,3±0,7 × 10^2	58,7±4,0
4	*Rhodotorula gracilis* CNM-YS-05	LD	1,8±0,2 × 10^4	2,1±0,1× 10^2	54,4±0,7
		10% LD	1,0±0,2 × 10^4	1,1±0,1 × 10^2	50,4±1,5
5	*Rhodotorula gracilis* CNM-YS-06	LD	5,0±0,3 × 10^4	2,0±2,0 × 10^2	46,9±8,5
		10% LD	8,7±1,7 × 10^3	1,1±0,1 × 10^2	51,2±1,9
6	*Hansenula anomala* CNM-YS-07	LD	8,2±1,4 × 10^4	3,3±1,7 × 10^2	50,7±3,9
		10% LD	1,7±0,4 × 10^4	3,0±2,3 × 10^2	56,7±9,4
7	*Rhodotorula glutinis* CNM-YS-08	LD	7,8±0,6 × 10^4	4,0±2,3 × 10^2	52,4±5,4
		10% LD	6,1±0,4 × 10^4	2,0±1,1 × 10^2	47,2±5,5
8	*Rhodotorula rubra* CNM-YS-09	LD	8,1±0,4 × 10^4	1,2±0,3 × 10^3	62,5±2,4
		10% LD	5,1±0,4 × 10^4	7,3±2,8 × 10^2	60,5±3,4
9	Rhodotorula *mucilaginosa* CNM-YS-10	LD	1,2±0,2 × 10^5	4,0±2,3 × 10^2	50,3±5,1
		10% LD	4,6±1,5 × 10^4	2,3±1,3 × 10^2	49,8±5,4
10	*Saccharomyces cerevisiae CNM-YS-11*	LD	6,2±1,1 × 10^4	6,7±1,7 × 10^2	58,8±2,1
		10% LD	2,0±0,3 × 10^4	3,0±1,1 × 10^2	57,3±3,8
11	*Lipomyces lipofer* CNM-YS-12	LD	6,9±0,7 × 10^4	1,3±0,5 × 10^3	64,2±4,6
		10% LD	3,4±0,7 × 10^4	8,0±2,3 × 10^2	63,9±2,4
12	*Lipomyces lipofer* CNM-YS-13	LD	1,3±0,5 × 10^4	8,0±3,4 × 10^2	70,1±5,9
		10% LD	3,8±0,4 × 10^4	9,3±4,0 × 10^2	64,4±4,5
13	*Lipomyces lipofer* CNM-YS-14	LD	1,8±0,3 × 10^4	8,7±5,3 × 10^2	68,1±5,5
		10% LD	1,5±0,5 × 10^4	1,8±0,9 × 10^3	77,8±3,2
14	*Saccharomyces carlsbergensis* CNM-YS-15	LD	1,4±0,4 × 10^4	4,5±1,0 × 10^3	88,8±0,5
		10% LD	8,0±2,3 × 10^3	3,3±0,5 × 10^2	90,3±4,5
15	*Saccharomyces cerevisiae* CNM-YS-16	LD	3,6±0,7 × 10^4	3,7±2,4 × 10^2	55,4±7,0
		10% LD	4,6±0,8 × 10^4	1,7±1,3 × 10^2	46,4±7,5
16	*Saccharomyces cerevisiae* CNM-YS-17	LD	8,6±0,4 × 10^4	3,0±2,0 × 10^2	49,3±5,2
		10% LD	4,3±0,4 × 10^4	1,7±1,3 × 10^2	46,6±7,2
17	*Saccharomyces cerevisiae* CNM-YS-18	LD	9,0±1,3 × 10^4	3,3±1,7 × 10^2	50,3±4,4
		10% LD	7,7±1,7 × 10^4	2,7±1,7 × 10^2	48,3±6,5

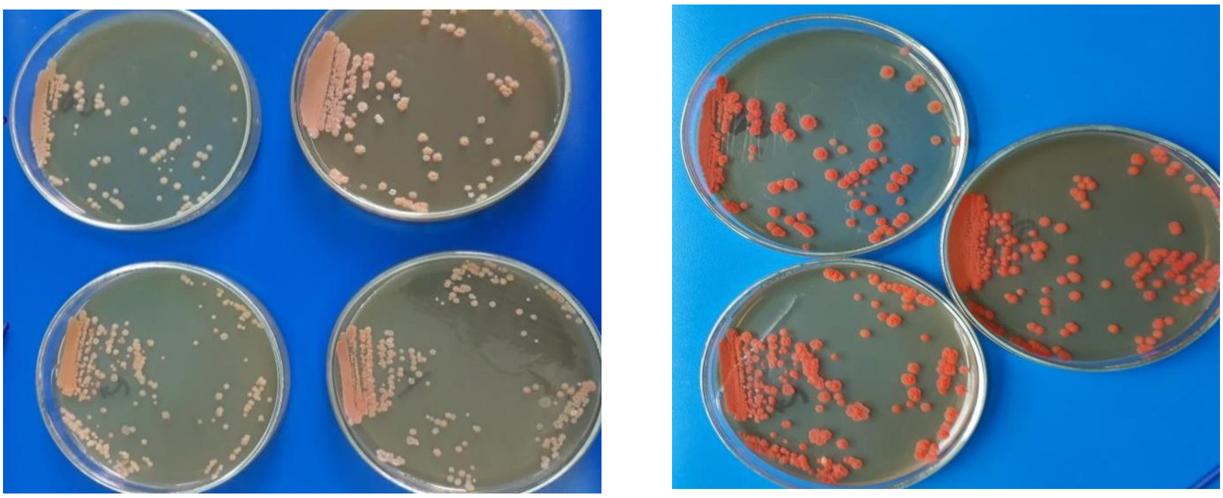
Datele prezentate demonstrează că titrul unităților formatoare de colonii (UFC ml^{-1}) ale tulpinilor de drojdii, după 15 ani de conservare în stare liofilizată, indiferent de mediul de protecție utilizat la liofilizare, a scăzut de la 10^4 până la 10^3, 10^2, cu 1-2 unități. S-au atestat însă și unele excepții unde titrul a scăzut cu o unitate (*Rhodotorula gracilis* CNM-YS-03 (10% LD), *Lipomyces lipofer* CNM-YS-12 (LD), *Saccharomyces carlsbergensis* CNM-YS-15 (LD, 10% LD). Astfel, s-a stabilit că viabilitatea tulpinilor de drojdii ce aparțin genului *Rhodotorula,* după 15 ani de păstrare în stare liofilizată, au variat în limitele 47,0-65,7%, comparativ cu viabilitatea înregistrată după liofilizare. La tulpinile din genul *Lipomyces* viabilitatea a fost puțin mai mare și a variat în limitele 64-77,8%. Cea mai joasă viabilitate a fost înregistrată la tulpinile de drojdii ce aparțin genului

Saccharomyces, care au variat de la 46,4% până la 58,8%, cu excepția tulpinii *Saccharomyces carlsbergensis* CNM-YS-15. La această tulpină viabilitatea, după 15 ani de conservare în stare liofilizată, a constituit 88,8-90,3%, comparativ cu cea atestată imediat după liofilizare.

În rezultatul examinării coloniilor de drojdii, după reactivarea din starea de anabioză, s-a observat că sporirea lor, în primul pasaj, a fost mai lentă. Culoarea coloniilor de drojdii din genul *Rhodotorula* a fost roz pal față de roz intens, care a fost până la liofilizare, iar după 2-3 pasaje ea a revinit la starea inițială. Coloniile tulpinilor din genul *Saccharomyces* au fost albe, mici, iar după 2-3 pasaje au revinit la dimensiunile inițiale. La tulpinile din genul *Lipomyces* nu s-au observat schimbări semnificative ale coloniilor după reactivare (la 1 pasaj, dimensiunile și culoarea coloniilor au corespuns cu descrierea din pașaportul de depozitare).

Astfel, am constatat că, după 2-3 pasaje, modificările particularităților morfo-culturale apărute, la unele culturi în perioada de păstrare în stare liofilizată, s-au restabilit total.

Evaluarea viabilității și stabilității tulpinilor de drojdii menționate, păstrate sub ulei de vaselină, a demonstrat că, la inocularea direct pe medii agarizate, tulpinile s-au dezvoltat lent și foarte slab (durata de cultivare 5-7 zile (comparativ cu 3-5 zile), colonii foarte mici, culoarea pală). Pentru a stimula creșterea culturilor de drojdii, acestea au fost inoculate inițial în tuburi cu mediul malț lichid, apoi au fost trecute pe medii agarizate, în cutii Petri. S-a observat că în primul pasaj culturile s-au dezvoltat slab, coloniile au fost mici, culoarea pală, dar după 3 pasaje particularitățile morfo-culturale inițiale s-au restabilit (coloniile au fost mai mari, culoarea mai pronunțată) (fig.1) și au corespuns descrierii din pașaportul de depozitare.



Pasajul 1 Pasajul 3

Figura 1. Colonii de drojdii *Rhodotorula gracilis*, ce au fost păstrate 15 ani sub un strat de ulei de vaselină, pe mediul agarizat după primul și al 3-lea pasaj.

Astfel, s-a stabilit că toate tulpinile de drojdii studiate, păstrate sub ulei de vaselină, au fost viabile, iar particularitățile morfo-culturale inițiale s-au restabilit după regenerarea în malț lichid și efectuarea consecutivă a 2-3 pasaje pe medii agarizate.

DISCUȚII

Liofilizarea constituie o metodă de depozitare pe termen lung și este utilizată în toate colecțiile mari pentru conservarea multor tipuri de bacterii și ciuperci. Principiul metodei este de a usca celulele din starea congelată sub vid, ocolind faza lichidă (23, 27).

Viabilitatea microorganismelor în timpul liofilizării este influențată de o serie de factori: condițiile de cultivare (pH și temperatură), vârsta culturii, concentrația celulară, compoziția mediului de protecție și activitatea metabolică. Optimizarea acestor procese face posibilă salvarea de până la 80-90% dintre celulele viabile (28). Mediile optime de cultivare a drojdiilor înainte de liofilizare sunt considerate mediile: Sabouraud, glucoză-peptonă și malț-agar (29). Studiul viabili tății și al stabilității a 557 tulpini de drojdii, reprezentanți ai 17 genuri după 19-30 de ani de

depozitare în stare liofilizată, în colecția olandeză, a făcut posibilă stabilirea modificărilor apărute la grupuri individuale. Astfel, speciile de drojdii cu celule mici și ascospori, cum ar fi *Pichia, Hansenula* și *Debaryomyces*, au prezentat o supraviețuire bună, în timp ce drojdiile cu celule mari, slab sporulate sau nesporulate din genul *Saccharomyces, Kluyveromyces, Dekkera* și *Brettanomyces* prezintă o rată de supraviețuire mai mică. *Sporobolomyces, Rhodotorula* și *Cryptococcus* nu au rezistat depozitării pe termen lung în stare liofilizată. La drojdiile *Candida solani* și *Candida lipolitica* s-a constatat că, după 3 luni de păstrare, au apărut modificări ale metabolismului oxidativ, ale factorilor de creștere și de osmotoleranță (30).

Rezultatele obținute în studiul dat au demonstrat că tulpinile de drojdii, în funcție de gen, suportă diferit procesul de liofilizare și de depozitare în stare liofilizată. Astfel, după 15 ani de păstrare în stare liofilizată, viabilitatea drojdiilor din genul *Rhodotorula* a constituit 47,0-65,7%, iar a tulpinilor din genul *Saccharomyces* – 46,4-58,8%, comparativ cu viabilitatea înregistrată după liofilizare. De asemenea, la tulpinile menționate, după rehidratare, au fost depistate modificări morfo-culturale (colonii foarte mici, culoarea diferită de cea inițială), iar după 2-3 pasaje consecutive culturile au revenit la starea inițială. Tulpinile din genul *Lipomyces* au demonstrat o stabilitate a proprietăților morfo-culturale mai înaltă și o viabilitate de 64,0-77,8%.

Experiența multor colecții mărturisesc rezultatele de succes ale metodei de depozitare a culturilor de drojdii sub un strat de ulei mineral. Pentru drojdiile de vin, în special, s-a demonstrat că atunci când sunt depozitate sub ulei de vaselină, cu reînsămânțare, chiar și după 2-4 ani, supraviețuiesc bine și nu își pierd proprietățile de fermentație (31, 32). Din 1244 de tulpini de drojdii, mucegaiuri, streptomicete și bacterii, din Colecția American Type Culture, conservate sub ulei, după 12-18 luni de păstrare, au supraviețuit 96% dintre culturi. Aceleași rezultate au fost obținute în colecția Laboratorului Micologic al Institutului Educațional de Igienă și de Medicină Tropicală din Londra și în colecția Institutului Unional de Cercetare Științifică de Microbiologie Agricolă din Sankt Petersburg (10, 33).

Există date ce confirmă păstrarea celulelor vii de drojdie sub ulei timp de până la 10 ani sau mai mult, fără reînsămânțare (34, 35). Datele obținute în acest studiu, de asemenea, demonstrează că, tulpinile de drojdii pot fi păstrate o durată îndelungată (15 ani), sub un strat de ulei de vaselină, cu reînsămânțări periodice de 5 ani.

Aceste rezultate denotă faptul că metodele de conservare sub un strat de ulei mineral și în stare liofilizată sunt foarte eficiente și de perspectivă, deoarece garantează o viabilitate și o stabilitate sigură pentru o perioadă îndelungată.

CONCLUZII

1. Viabilitatea tulpinilor de drojdii studiate, după 15 ani de conservare în stare liofilizată și sub un strat de ulei de vaselină sunt viabile, iar particularitățile morfo-culturale se restabilesc după 2-3 pasaje consecutive pe medii agarizate.
2. Viabilitatea tulpinilor de drojdii, după 15 ani de păstrare în stare liofilizată, variază în funcție de gen de la 46,4% până la 77,8%.
3. Pentru revitalizarea și restabilirea proprietăților morfo-culturale inițiale a tulpinilor de drojdii, păstrate sub un strat de ulei de vaselină, se recomandă inocularea lor în tuburi cu mediul malț lichid, apoi transferul pe mediul agarizat și efectuarea a 3 pasaje consecutive.

CONFLICT DE INTERESE

Toți autorii declară că nu au conflict de interese.

MULȚUMIRI ȘI FINANȚARE

Cercetările au fost finanțate în baza proiectului 20.80009.7007.09 (ANCD).

REFERINȚE

1. Colwell RR. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 1997;18:302-07.
2. Prakash O, Shouche Y, Jangid K, Kostka JE. Microbial cultivation and the role of microbial resource centers in the omics era. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2012;97:51-62.
3. Cánovas M, Iborra JL. Culture collections and bio

chemistry. *International Microbiology.* 2003;6: 105-12.
4. Demain AL. Small bugs, big business: The economic power of microbe. *Biotechnology Advances.* 2000;18:499-514.
5. Çaktü K, Türkoğlu EA. Microbial Culture Collections: The essential resources for life. *Gazi University Journal of Science.* 2011;24(2):175-80.
6. Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd ed. Springer*, US; 2005:111-2.
7. Waites MJ, Morgan NL, Rockey JS, Higton G. In: *Industrial Microbiology: An Introduction 1st ed. Blackwell Science*, Great Britain; 2001:78-9.
8. Uruburu F. History and services of culture collections. *International Microbiology.* 2003;6: 101-3.
9. Wu L, Sun Q, Sugawara H, Yang S, Zhou Y, McCluskey K, et al. Global catalogue of microorganisms (GCM): a comprehensive database and information retrieval, analysis, and visualisation system for microbial resources. *BMC Genomics.* 2013;14:933.
10. Arkad´eva AZ. Kollektsiya mikoorganizmov kafedry mikrobiologii MGU [Collection of microorganisms of the Department of Microbiology, Moscow State University]. *Materialy mezhdunarodnoi konferentsii „Problemy ekologii i fiziologii microorganizmov", k 100-letiiu so dnia rozhdeniia professora E.E. Uspenskogo*; 2000; Moskva.
11. Uzunova-Doneva T, Donev T. Anabiosis and conservation of microorganisms. *Journal of Culture Collections*. 2005;4:17-28.
12. Santos MJS, Trufem SFB, De Oliveria PC. Viability and morphological stability of *Absidia* strains during long-term maintenance under mineral oil. *Journal of Basic Microbiology.* 2000;40(2):133-6.
13. Galich EL, Berestetskii AO. Griby – vozbuditeli boleznei rastenii [Fungi - pathogens of plant diseases]. *Mikologia i fitopatologiia.* Sankt-Peterburg, „Nauka". 2007;41(4):342-5.
14. Iakovleva MB, Khoang TL, Nikitina ZK. Kolagenoliticheskaia aktivnost´u nekotoryh vidov deiteromitsetov pri razlichnyh metodah hranenia [Collagenolytic activity of some types of deuteromycetes in various storage methods]. *Pricladnaia Biohimia i Microbiologiia*. Moskva, „Nauka". 2006;42(4):489-92.
15. Sîrbu T. Viabilitatea micromicetelor în funcție de condițiile utilizate în procesul de liofilizare. *Intellectus.* 2017;4:108-13.
16. Osin AV, Cherviakova HS, Valova TV. Liofilizatsiia shtammov patoghennyh microorganizmov na sublimatsionnyh ustanovkah raznovo tipa i otsenka kachestva poluchennyh preparatov [Lyophilization of strains of pathogenic microorganisms in sublimation plants of various types and assessment of the quality of the obtained preparations]. *Problemy osobo opasnyh infektsii*. 2016;3:66-70.
17. Pohilenko VD, Baranov AM, Detushev KV. Metody dlitel´nogo hraneniia kollektsionnyh mikroor ganizmov i tendentsii razvitiia [Long term storage methods for collection microorganisms and development trends]. Izvestiia vysshih ychebnyh zavedenii. Hranenie Kollektsionyh Cul'tur Mikroorganizmov i Tendentsii Razvitia. *Povolzhskii region. Meditsinskie nauki.* 2009;4(12):99-121.
18. Kupletskaia MB, Netrusov AI. Zhiznesposobnost, liofilizirovannyh microorganizmov posle 50 let hranenia [Viability of lyophilized microorganisms after 50 years of storage]. *Mikrobiologiia.* 2011;80(6):842-6.
19. Sîrbu T. Viabilitatea și stabilitatea micromicetelor păstrate sub ulei mineral. *Intellectus.* 2017;1:69-74.
20. Navarta LG, Calvo J, Calvente V, Benuzzi D, Sanz MI. Freezing and freeze-drying of the bacterium Rahnellaaquatilis BNM 0523: study of protecting agents, rehydration media and freezing temperatures. *Letters in Applied Microbiology.* 2011; 53(5):565-71.
21. Prakash O, Yogesh N, Yogesh S. Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiology Letters.* 2013;339(1):1-9.
22. Tereshina VM, Memorskaia AS, Kotlova EP, Vliianie pazlichnyh teplovyh bozdeistvii na sostav membrahhyh lipidov i uglevodov tsitozolia u mitselial´nyh gribov [Influence of Pathological Thermal Influences on the Composition of Membrane Lipids and Cytosolic Carbohydrates in Mycelial Fungi]. *Mikrobiologiia.* 2011; 80(4):447-53.
23. Kanterova AV, Aleshkebich II, Novik GI. Sohranenie zhiznesposobnosti i svoistv drozhei Saccharomyces cerevisiae metodom liofilizatsii [Preservation of viability and properties of yeast Saccharomics cherevisiae by lyophilization]. *Actual´nye aspekty sovremennoi mikrobiologii. Tezisy VI Molodezhnoi shkoly–konferentsii s mezhunarodnym uchastiem.* Moskva, 25-27 oktiabria 2010.
24. Morgan C, Vesey G. Freeze-Drying of Microorganisms. *In: Encyclopedia of Microbiology (Third Edition).* Oxford: Academic Press; 2009:162-73.
25. Netrusov AI. *Praktikym po mikrobiologii [Work on Microbiology].* Moskva: Akademiia; 2005.
26. Muñoz-Rojas J, Bernal P, Duque E, Godoy P, Segura A, RAMOS J.-L. Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of Pseudomonas putida KT2440 to freeze-drying. Applied Environmental Microbiology. 2006; 72(1):472-7.
27. Kitamoto Y, Suzuki A, Shimada S, Yamanaka K. A new method for preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. Mycoscience. 2002;43: 143-9.
28. Shul´ga SM, Tigynova EA, Tkachenko AF, Beiko

NE, Homenko AI. Vliianie liofilizatsii na zhiznes-posobnoct´ drozhzhei Pichia anomala Zh-1 [Influence of lyophilization on the viability f yeast Pichia anomala Zh-1]. *Biotehnologiia*. 2011;4(4): 80-6.
29. Ostrouhova ZA. Sohranenie sboistv binnyh drozhzhei metodom liofil´noi cushki [Preservation of the properties of wine yeast by freeze drying]. *Mikrobiologiia*. 1981;30(2):341-5.
30. Krasil´nikov NA. *Medody hraneniia kollektsionnyh kul´tur mikroorganizmov* [Methods for storing collection cultures of microorganisms]. M: Nauka; 1976.
31. Abdulgamidova SM. Hranenie kollektsionnyh drozhzhevyh kul´tur pod vazelinovym maslom. *Trudy Instituta Mikrobiologii NAN Azerbaidzhana. Baku: Elm.* 2007;5:110-7.
32. Ganbarov HG, Abdulgamidov SM. Metody hranenii droahevyh kul´tur v kolektsii (Obzor) [Storage methods for yeast cultures in a collection (Review)]. *Vesti Bakinskogo Universiteta. Seriea estesstvennye nauki*. 2013;2:75-83.

Data recepționării manuscrisului: 25/02/2022
Data acceptării spre publicare: 28/05/2022

33. Kudreavtsev VI, Fateeva MB, Nikitina TN. Hranenie kollektsionnyh drozhzhevyh kul´tur pod mineral´nym maslom [Storage of collection yeast cultures under mineral oil]. *Mikrobiologiia*. 1982; 41(5):903-8.
34. Podgorskii VS, Golovich TN, Cudenko VI. Osobennosti hraneniia mikroorganizmov, deponirovannyh v Institute microbiologii i virusologii NAN Ukrainy [Features of storage of microorganisms deposited at the Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine]. *Materialy mezhdunarodnoi konferentsii „Microbiologiia i biotehnologiia na rubezhe 21 stoletiia”*. Minsk, 2000.
35. Fateeva MV. Opredelenie stepeni byzhivaemosti drozhzhevyh organizmov posle hraneniia pod vazelinovym maslom [Determination of the degree of survival of yeast organisms after storage under liquid paraffin]. *Microbiologiia*. 1985;36(2):350-4.